

Flow cytometry 法による *Candida species* の 迅速な薬剤感受性測定法の開発

黒田 隆也

近畿大学医学部臨床病理学教室

抄 録

日和見感染症での真菌感染者は増加傾向にある。なかでも *Candida species* 特に *Candida albicans* は院内感染の主な原因菌の一つとなっている。また、深在性真菌症の診断は困難であるが、早期の診断や治療は極めて重要である。これまで酵母様真菌の薬剤感受性試験は適切な培養液が得られず、細菌の薬剤感受性検査と比較すると立ち遅れが見られた。しかし、National Committee for Clinical Laboratory Standards において標準法 (M27-T) が1995年に提案されてから、本法による酵母様真菌の薬剤感受性試験が多くの施設で行われるようになり、耐性株、耐性機構や耐性遺伝子などに関する報告が多くなされるようになった。

臨床分離株の *Candida albicans* 25株, *Candida tropicalis* 18株と *Candida glabrata* 27株などの amphotericin B (AMPH) や fluconazole (FLCZ) に対する薬剤感受性検査を flow cytometry 法により行った。蛍光色素としては生菌細胞 (*Candida*) の核酸へ選択的結合する FUN-1 を使用した。生菌細胞は cylindrical intravacuolar structures (CIVS) を形成するが、死菌では CIVS を形成しない。培養液内で AMPH (3時間), FLCZ (24時間) を作用させ、FUN-1 色素の取り込みから抗菌活性を測定した。また、標準法である NCCLS 法とも比較検討を行った。

MIC 測定成績は次のようになり、AMPH に対しては *Candida albicans* (0.5~2 µg/ml), *Candida tropicalis* (0.5~2 µg/ml), *Candida glabrata* (0.5~4 µg/ml), FLCZ に対しては *Candida albicans* (0.125~64 µg/ml), *Candida tropicalis* (0.125~64 µg/ml), *Candida glabrata* (0.125~64 µg/ml) であった。測定成績から両法に良い相関が認められ、flow cytometry 法は精度にも優れていた。培養法に比較して短時間で薬剤感受性成績が得られるので、迅速な薬剤感受性検査として期待できる方法である。

Key words : flow cytometry, FUN-1, *Candida species*, susceptibility testing, MIC

緒 言

Candida 属による二次性の真菌感染症は過去30年間、着実に増加傾向にある。真菌感染症の増加の原因として広範囲スペクトラム抗菌剤の過剰投与、糖尿病、癌や臓器移植などでの遷延する免疫不全状態やヒト免疫不全ウイルス感染症や高度な集中治療などが知られている¹⁻³。

とりわけ、*Candida albicans* (*C. albicans*) は院内感染の主たる原因菌の一つになっている。臨床的にも日和見感染症患者での、深在性真菌症の診断は困難であるが、早期の診断や治療はきわめて重要である。現在、抗真菌剤として fluconazole (FLCZ, トリアゾール系化合物), miconazole (MCZ, イミ

ダゾール系化合物) や amphotericin B (AMPH, ポルエン系抗生物質) などが主に使用されている。

しかしながら、酵母様真菌 (*Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*) の薬剤感受性試験は、これまで適切な培養液が得られず、細菌の薬剤感受性試験と比較して、著しい立ち遅れが見られていた。しかし、1995年に米国の National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{4,5} において酵母様真菌の薬剤感受性試験標準法 (M27-T) が設定されてから、*C. albicans* を中心とする薬剤感受性についての研究が活発に行われるようになった⁶⁻¹⁰。そして、これまでは明らかにされなかった酵母様真菌の薬剤感受性成績、耐性化機構や耐性遺伝子などに関する研究が多くなされるようになった¹¹⁻¹⁴。この

ように酵母様真菌の minimum inhibitory concentration (MIC) 測定法が行われるようになり、臨床分離株では各種抗真菌剤の酵母様真菌に対する薬剤感受性成績やそれら耐性株の存在が次第に明らかにされている^{1,2}。

しかしながら、本法は培養法であるため、分離培養で純培養菌を得てから、さらに抗真菌剤の入った培養液 (RPMI 1640) で35°C、48時間の培養を必要とし、薬剤感受性成績が得られるまでに分離培養に1日、感受性検査に2日の合計3日を必要とするので、治療に必要な抗菌剤を迅速に選択することが困難であった。

しかし、検査時間を短縮するためには培養法では解決できない。本研究では、迅速な薬剤感受性検査が可能な FUN-1 色素を使用した flow cytometry 法 (FCM 法) による薬剤感受性試験を行ない、同時に NCCLS 法とも測定精度について比較検討を行った¹⁵。

方 法

材料

薬剤感受性測定菌株として、臨床分離株 *C. albicans* 23株、*C. tropicalis* 18株と *C. glabrata* 27株を用い、さらに、標準株として *C. albicans* ATCC90028, 90029 を使用した。

使用薬剤

amphotericin B (E.R. Squibb & Sons, Princeton) と fluconazole (Pfizer, Groton) を使用した。

方法

FCM 法：FACS Calibur (Becton Dickinson) を使用し、*Candida* 属の薬剤感受性測定を行った (図1)。測定にあたっては、菌数を0.5 McFarland 標準濁度 (およそ $1 \sim 5 \times 10^6$ CFU/ml) に菌液を調整した。この調整培養菌液1500 μ l を入れた小試験管内に

AMPH と FLCZ の希釈薬剤溶液125 μ l を添加した。なお、添加薬剤濃度は AMPH は、0.03~16 μ g/ml、FLCZ では0.125~64 μ g/ml とした。そして、vortex 振盪後35°Cの孵卵器内で、AMPH は3時間、FLCZ では24時間、小試験管内で反応させた。

次いでこれら sample に最終濃度が5 μ mol になるように FUN-1 を添加、調整した。振盪後、35°Cで30分反応させた。これを試料として FACS Calibur で測定した。

まず試料を測定専用容器に300 μ l を入れ、菌数5000個の蛍光強度を測定した。蛍光色素 FUN-1 は488 nm のレーザー光を吸収し、励起された FUN-1 は585 nm の波長の蛍光を発するので、これを FCM で測定した。

FCM での薬剤感受性測定はコントロール (薬剤無添加) に比較して、試験菌液 (薬剤添加) の相対蛍光強度が80%以下となった濃度を MIC とした。

測定原理としては蛍光色素である FUN-1 を使用し、*Candida* 属での FUN-1 の菌体への取り込みを調べた。すなわち生物学的に活性状態にある生菌は菌体内の vacuole (空胞) に FUN-1 を取り込み、cylindrical intravacuolar structures (CIVS) と呼ばれる円柱状の構造物を形成することが知られ、CIVS はレーザー光により赤い色素を発する。しかしながら、生物活性が消失した真菌細胞では、蛍光色素を取り込んでも CIVS が形成されないため、赤い蛍光を発しないことを利用している。

FCM 法による薬剤感受性試験以外にも、CIVS の形成を証明するため、培養真菌細胞に FUN-1 色素を加え、1時間後に、蛍光顕微鏡下で CIVS 形成の有無を見た (図2)。図2 A の薬剤無添加の *C. albicans* では明らかな CIVS 形成が認められた。しかし、図2 B の70%エタノール添加では CIVS の形成は認められなかった。

【方法】

FCM 法 *Candida albicans* 10^6 CFU/ml に調製した菌液を作製。
 ↓
 菌液1500 μ l に薬剤溶液を125 μ l 添加し、AMPH 最終濃度0.03~16 μ g/ml となるように調製。
 FLCZ 最終濃度0.125~64 μ g/ml。
 ↓ 35°C, 3 or 24 hr, incubation
 上記検体に FUN-1 を添加し、最終濃度5 μ mol 等調製。
 ↓ 35°C, 30 min, incubation
 FACS Calibur (Becton Dickinson) で菌数と蛍光強度を測定。
 Cell Quest soft で解析。

図1 Flow cytometry 法の測定法

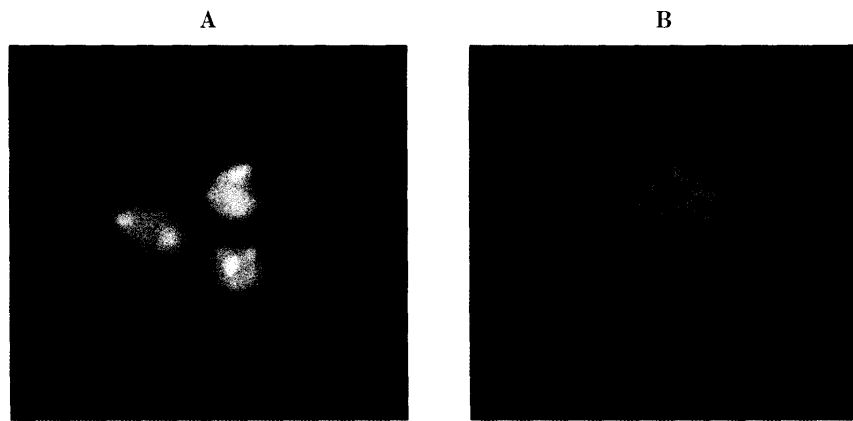


図2 Cylindrical intravacuolar structures (CIVS) の形成 (×1000)

A) 薬剤非添加
FUN-1 は生菌内の空胞内に取り込まれ、CIVSと呼ばれる微小な円柱構造を形成する。
CIVS はレーザー光により赤い蛍光を発する。
B) 70%エタノール添加
生物活性の消失した真菌では、色素を取り込んでもCIVSを形成しないため、蛍光を発しない。

また、FCM 法での成績と比較するために国際的標準法とされる NCCLS 法 (M27-T) に準拠した微量液体希釈法でも行った。そして、*C. albicans*, *C. tropicalis* と *C. glabrata* の 3 菌種について薬剤感受性検査を行った。各薬剤の MIC 測定濃度域は AMPH では $0.03 \mu\text{g/ml}$ から $16 \mu\text{g/ml}$, FLCZ では $0.125 \mu\text{g/ml}$ から $64 \mu\text{g/ml}$ とした。微量液体希釈法は、MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) 緩衝 (pH 7.0) RPMI 1640 液体培地 (sigma) を使用し、接種菌量 $1 \sim 5 \times 10^3$ CFU/ml, 35°C , 48 時間の培養条件下で行った。

培養後、microplate reader MTP100[®] (Corona Industrial) を用いて、492 nm での microplate の各ウェルの濁度を分光光学的に測定した。終末点判定は、コントロールに対し AMPH では 100% 発育抑制、FLCZ では 80% 以上の発育抑制が見られる濃度を MIC とした。

結 果

FCM 法による薬剤感受性試験を実施するにあたり、以下のような基礎的検討を行った。

測定条件についての基礎的検討

1) 測定菌数について

測定に適正な菌数を得るため ATCC90028 の 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/ml の菌液を作製し、測定を行った (図 3)。FACS Calibur によるドットプロット法による解析結果を示す。X 軸には蛍光強度、Y 軸には細胞の内部構造を示す。(a) は薬剤無添加、(b) は薬剤添加でのドットプロットグラムである。

10^5 CFU/ml では菌数濃度が少なく、FACS Calibur による測定条件に必要な 5000 個の測定ができず、また、菌数が 10^7 CFU/ml 以上では、コントロールでの平均蛍光強度の低下が見られた。そのため、最も安定した成績が得られる 10^6 CFU/ml を測定菌

数とした。

2) FUN-1 濃度について

FUN-1 濃度 5, 10, 20 μmol で基礎的検討を行った (図 4)。いずれの濃度においても蛍光強度には明らかな差は認められなかったため、FUN-1 濃度を最小濃度である 5 μmol とした。

3) 薬剤作用時間について

a) AMPH について

AMPH の薬剤作用時間を 1 時間、3 時間、6 時間と 24 時間で検討した。1 時間では、蛍光強度の低下は不安定であったが、3 時間の作用では明らかな蛍光強度の低下があり、抗菌活性が認められた。これより AMPH の作用時間を 3 時間とした。

b) FLCZ について

FLCZ の薬剤作用時間を 1 時間、3 時間、6 時間と 24 時間で検討した (図 5)。6 時間までは、蛍光強度の低下は見られず、24 時間の作用時間で、蛍光強度の低下が認められたため、作用時間を 24 時間とした。

精度についての検討

本法の精度を知る目的で、AMPH に対する MIC が $0.5 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ である ATCC90028 を用い、同時再現性について検討を加えたところ、5 回の繰り返し測定の結果、MIC はすべて $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ となり、AMPH での再現性は良好であった。

標準株での FCM の測定成績

ATCC90028 について AMPH 濃度希釈系列における蛍光強度の推移を示す (図 6)。

control の蛍光強度を 100% とすると $0.03 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ までは漸減傾向にあり、 $1 \mu\text{g/ml}$ では 20% 以上の急激な相対蛍光強度の低下が見られた。

なお、蛍光強度の実測値は、試験菌株ごとに接種菌量の多少による差が認められたため、成績の統一を図るために control (薬剤無添加) の蛍光強度を

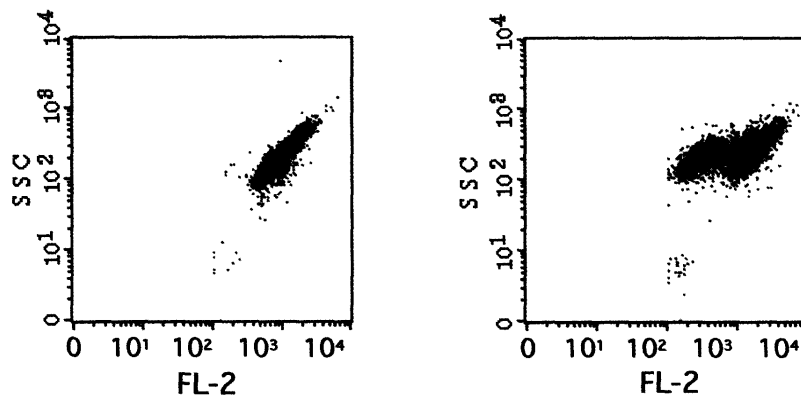
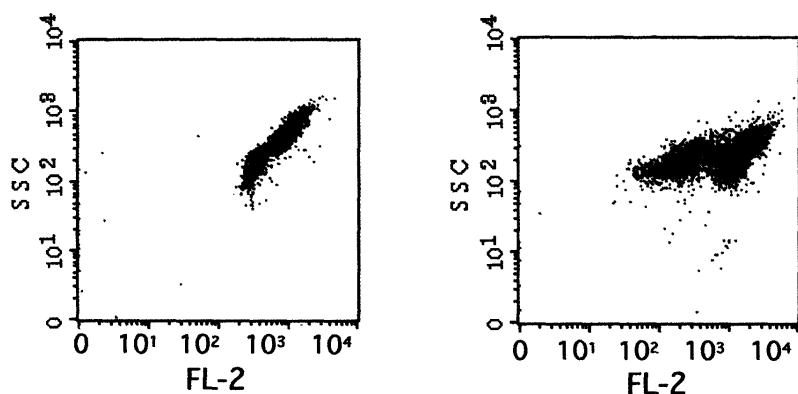
(a) 10^6 CFU/ml (b)(a) 10^7 CFU/ml (b)

図3 *Candida albicans* 測定菌数についての影響
 10^6 CFU/mlと 10^7 CFU/mlでの薬剤無添加(a)と薬剤添加(b)でのドットプロットグラムを示す。

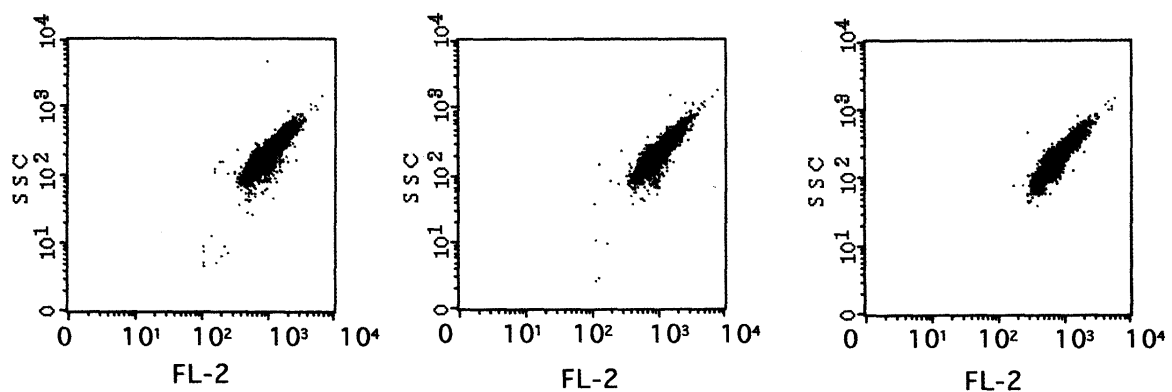
5 μ mol10 μ mol20 μ mol

図4 FUN-1 濃度の蛍光強度への影響

100%として、各種薬剤濃度希釈系列の蛍光強度を測定し、controlの蛍光強度に対する割合を相対蛍光強度とした。NCCLS法での成績を参考にして、MIC

の設定は、相対蛍光強度が80%以下になった濃度とした。

これより、図6のようにATCC90028株のMIC

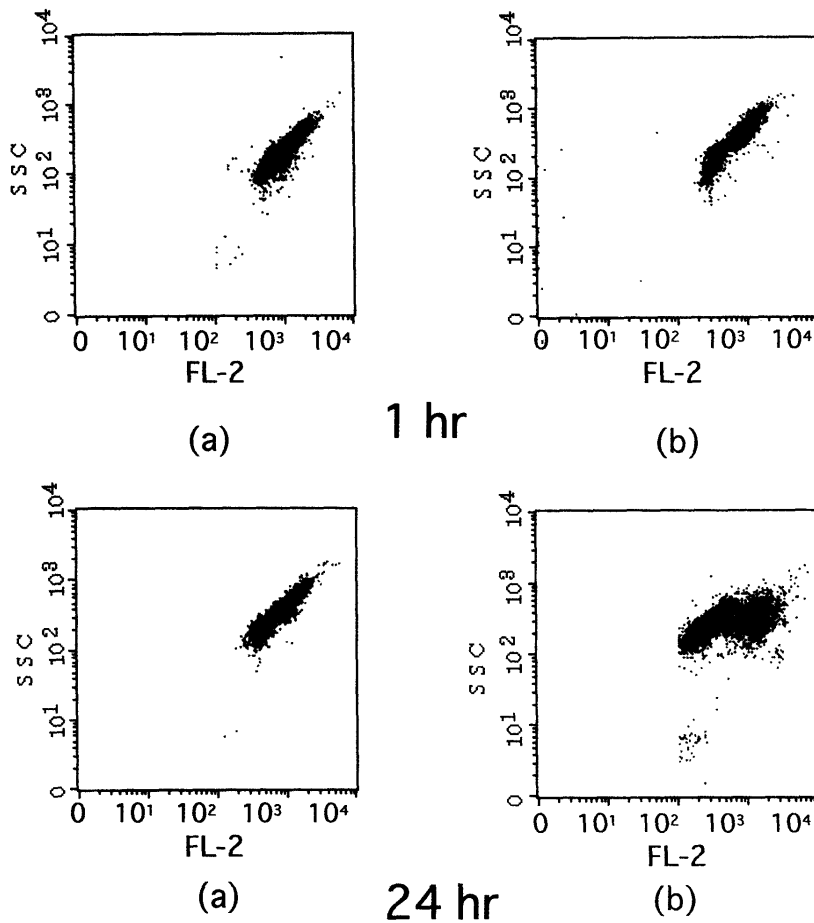


図5
Fluconazole の作用時間の影響
薬剤無添加(a)と薬剤添加(b)でのドットプロットグラムを示す。

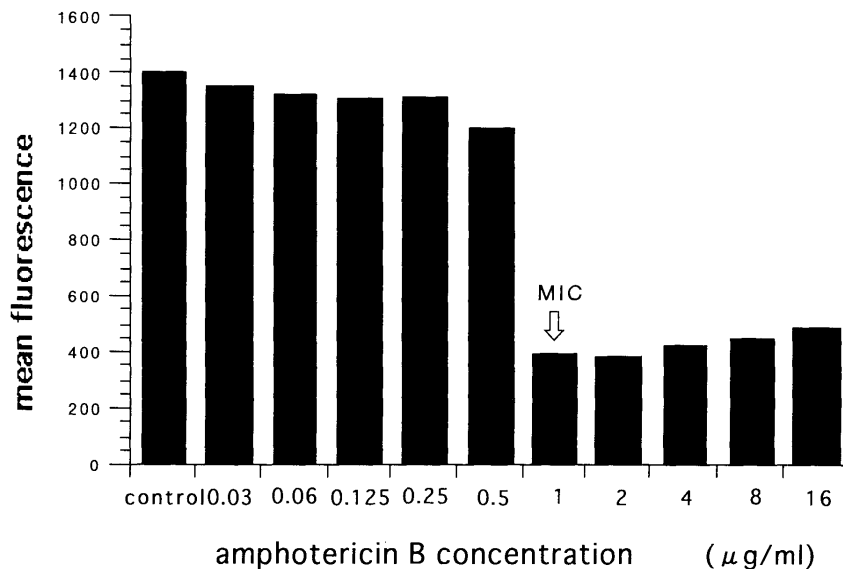


図6
Candida albicans ATCC90028 の amphotericin B に対する平均蛍光強度の変化
コントロールに比して平均蛍光強度が20%以上減少した薬剤濃度を MIC とした。

値を 1 μg/ml とした。以下同様に試験菌株の MIC 値を求めた。

4. 臨床分離株での FCM 法の測定成績

AMPH の *Candida* species に対する抗菌力について

図7に *C. albicans* 25株の相対蛍光強度をドットで示し、平均値を求めた。上述したように相対蛍光

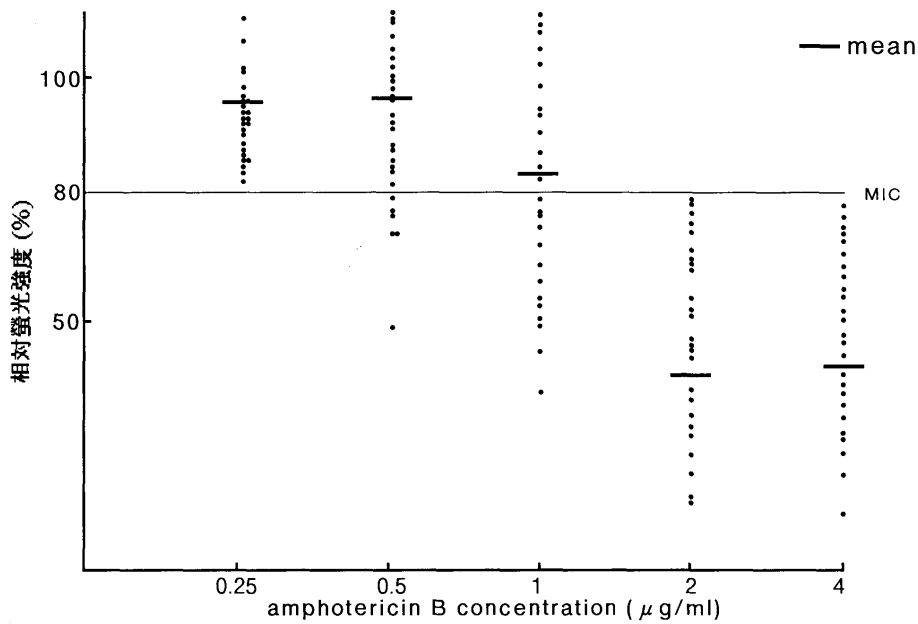


図7 Amphotericin B 濃度による *Candida albicans* の相対蛍光強度の推移 (n=25)

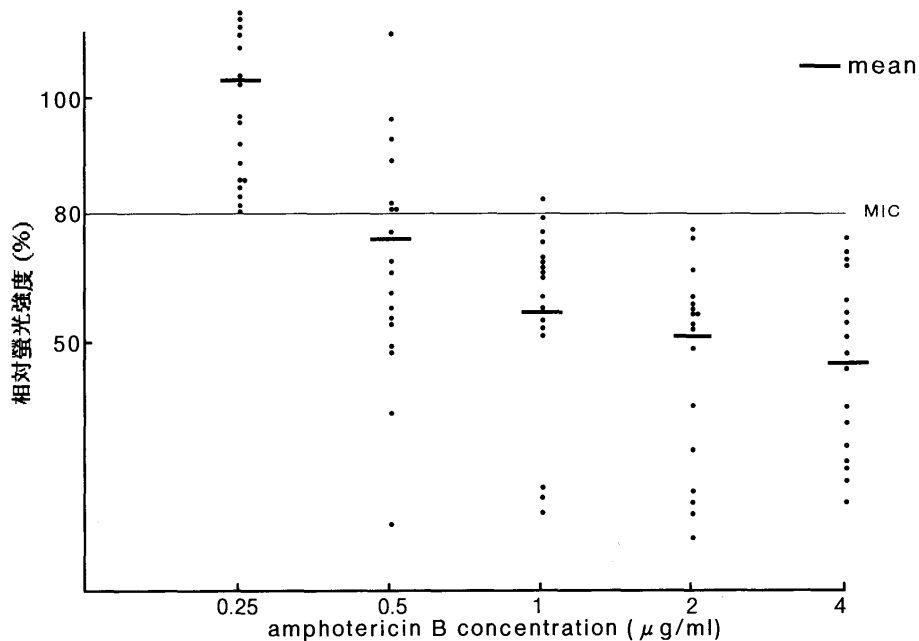


図8 Amphotericin B 濃度による *Candida tropicalis* の相対蛍光強度の推移 (n=18)

強度が80%以下 (MIC) の株を感受性とした。0.25 $\mu\text{g/ml}$ では、全株が80%以上、0.5 $\mu\text{g/ml}$ では6株が80%以下、1 $\mu\text{g/ml}$ では7株が、2 $\mu\text{g/ml}$ 以上では全株が80%以下となった。

図8に *C. tropicalis* 18株の AMPH 感受性成績を示す。0.25 $\mu\text{g/ml}$ では、全株が80%以上、0.5 $\mu\text{g/ml}$ では11株が80%以下、1 $\mu\text{g/ml}$ では6株が、2 $\mu\text{g/ml}$ 以上では全株が80%以下となった。

C. glabrata 27株は0.25 $\mu\text{g/ml}$ では、全株が80%以上、0.5 $\mu\text{g/ml}$ では5株が80%以下、1 $\mu\text{g/ml}$ では10株が、4 $\mu\text{g/ml}$ 以上では全株が80%以下となった (図9)。

AMPH に対しては *C. tropicalis* が最も感受性であり、*C. glabrata* は、*C. albicans* と同様の成績を示した。

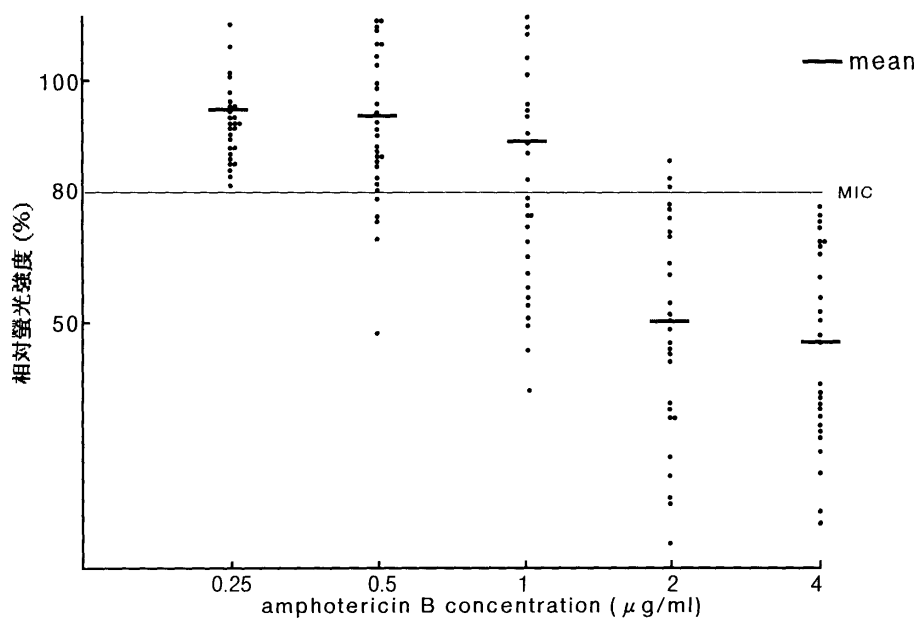


図9 Amphotericin B 濃度による *Candida glabrata* の相対蛍光強度の推移 (n=27)

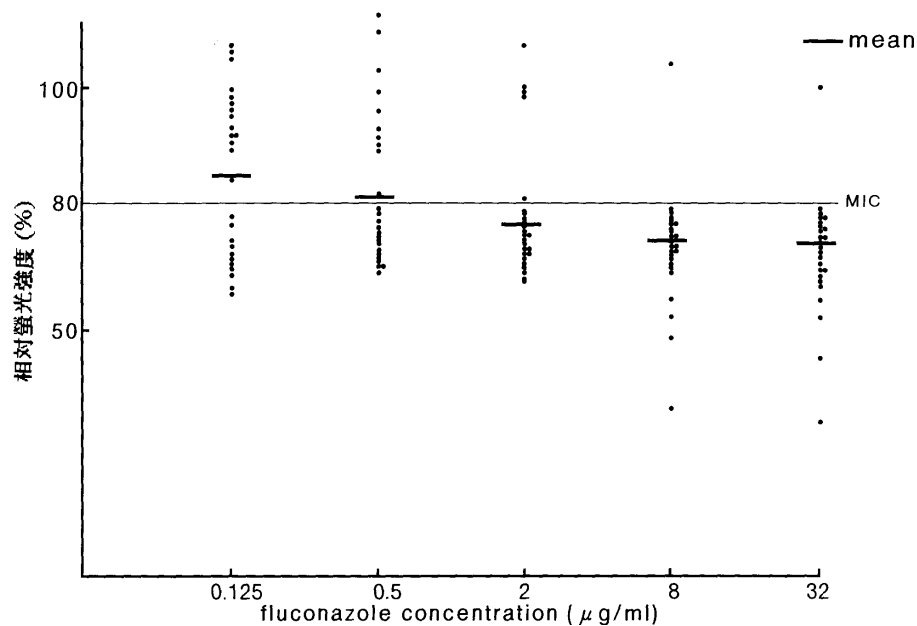


図10 Fluconazole 濃度による *Candida albicans* の相対蛍光強度の推移 (n=25)

FLCZ の *Candida* species に対する抗菌力について

FLCZ の *C. albicans* 25株に対する薬剤感受性成績を図10に示す。薬剤濃度0.125 µg/mlでの相対蛍光強度の平均は84%であり、80%以下のものは11株(44%)であり、以下薬剤濃度が高まるにつれ相対蛍光強度の平均値は下がり、明らかに2 µg/ml以上では大多数の株が80%以下であった。しかし、8 µg/ml以上においても相対蛍光強度が80%以上示すものが

1株見られた。なお、この株はNCCLS法でもMIC>64 µg/mlの耐性株であった。

図11に *C. tropicalis* 17株の薬剤感受性成績を示す。0.125 µg/mlの濃度で、平均値は78%であり、7株(41%)を除いては、感受性を示し、3菌種の中ではFLCZに最も高い感受性を示した。

図12にFLCZの *C. glabrata* 27株に対する薬剤感受性を示す。0.125 µg/mlでの相対蛍光強度の平均値は82%で、6株(22%)が80%以下で、0.5 µg/ml

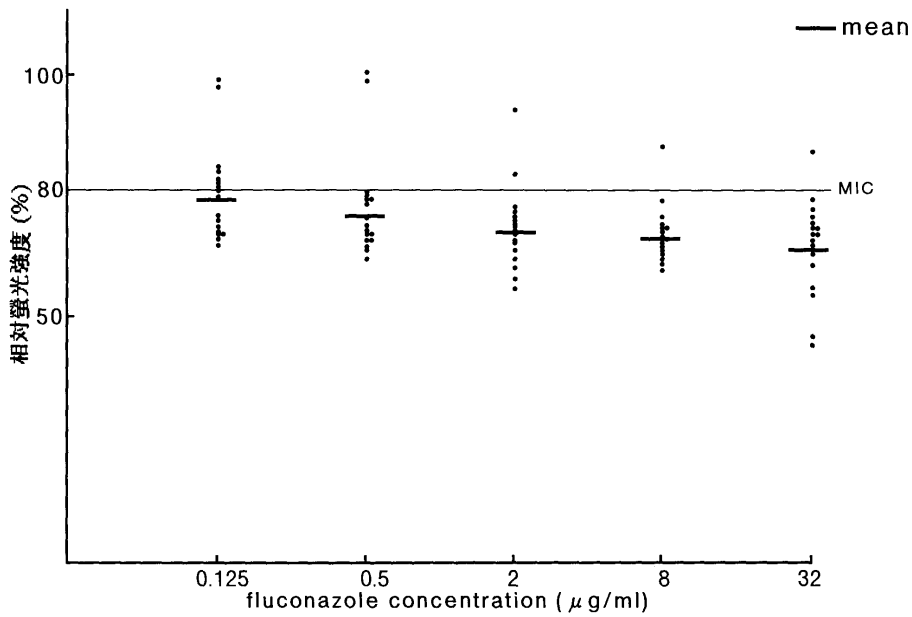


図11 Fluconazole 濃度による *Candida tropicalis* の相対蛍光強度の推移 (n=17)

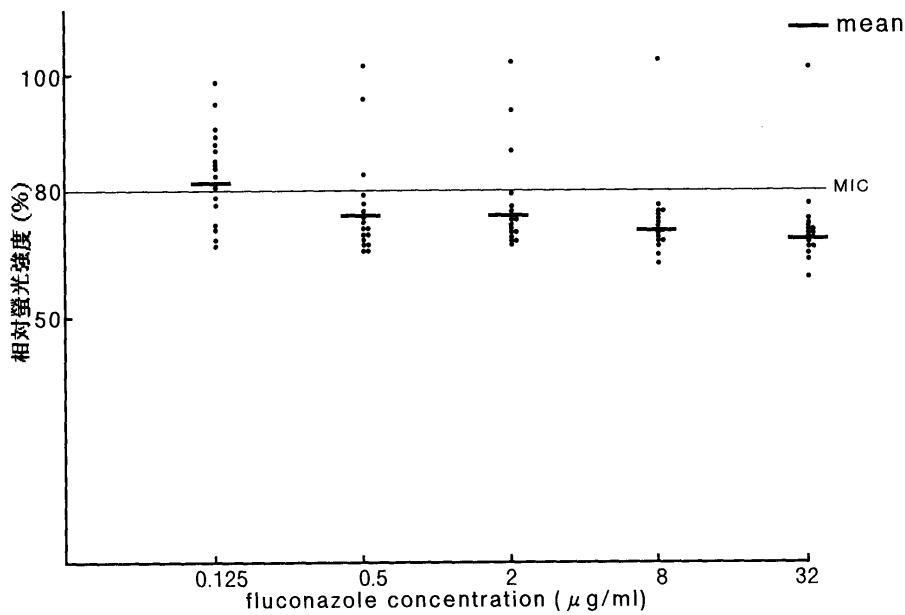


図12 Fluconazole 濃度による *Candida glabrata* の相対蛍光強度の推移 (n=17)

では11株が80%以下であった。この成績からは、*C. albicans* よりも感受性であった。

NCCLS 法との相関性について

FCM 法による薬剤感受性成績と酵母様真菌の薬剤感受性検査の標準法である NCCLS 法との比較検討を行った。

C. albicans について

C. albicans での FCM 法と NCCLS 法での AMPH と FLCZ に対する感受性成績を表 1, 2 に

示す。

C. albicans 25株の成績は AMPH に対して、FCM 法では全株が 0.5~2 μg/ml に分布し、NCCLS 法は 0.25~1 μg/ml に分布した。これより FCM 法は NCCLS 法に比較して MIC のうえで 1 管差の高値を示した。また、FLCZ に対して、FCM 法では 0.125~64 μg/ml に分布し、NCCLS 法は 0.125~64 μg/ml にあり、共に一致する成績が得られた。AMPH よりは広い範囲に分布した。

これらの成績からは両法には極めてよい相関が認

められ、AMPH での FCM 法と NCCLS 法との比較で、1 管差が見られたが、これは微量液体希釈法による MIC 法の許容範囲である 2 管差以内であった。

表 1 フローサイトメトリー法と M27-T による *C. albicans* の amphotericin B に対する MIC の比較

| test method | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------|--------------------------|-----|-----|
| | Rang | 50% | 90% |
| FCM 法 | 0.5-2 | 1 | 2 |
| NCCLS 法 | 0.25-1 | 0.5 | 1 |

表 2 フローサイトメトリー法と M27-T による *C. albicans* の fluconazole に対する MIC の比較

| test method | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------|--------------------------|-----|-----|
| | Rang | 50% | 90% |
| FCM 法 | ≤ 0.125 ->64 | 0.5 | 8 |
| NCCLS 法 | ≤ 0.125 ->64 | 0.5 | 8 |

表 3 フローサイトメトリー法と M27-T による *C. tropicalis* の amphotericin B に対する MIC の比較

| test method | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------|--------------------------|-----|-----|
| | Rang | 50% | 90% |
| FCM 法 | 0.5-2 | 0.5 | 1 |
| NCCLS 法 | 0.5-2 | 1 | 1 |

表 4 フローサイトメトリー法と M27-T による *C. tropicalis* の fluconazole に対する MIC の比較

| test method | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------|--------------------------|-------|-----|
| | Rang | 50% | 90% |
| FCM 法 | ≤ 0.125 ->64 | 0.125 | 0.5 |
| NCCLS 法 | ≤ 0.125 ->64 | 0.25 | 0.5 |

表 5 フローサイトメトリー法と M27-T による *C. glabrata* の amphotericin B に対する MIC の比較

| test method | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------|--------------------------|-----|-----|
| | Rang | 50% | 90% |
| FCM 法 | 0.5-4 | 1 | 2 |
| NCCLS 法 | 0.5-2 | 1 | 2 |

表 6 フローサイトメトリー法と M27-T による *C. glabrata* の fluconazole に対する MIC の比較

| test method | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------|--------------------------|-----|-----|
| | Rang | 50% | 90% |
| FCM 法 | ≤ 0.125 ->64 | 0.5 | 8 |
| NCCLS 法 | ≤ 0.125 ->64 | 0.5 | 4 |

た。また、FLCZ での FCM 法と NCCLS 法との比較で、AMPH よりも差は少なく、極めて高い相関を示した。

C. tropicalis について

FCM 法と NCCLS 法での AMPH と FLCZ に対する感受性成績を表 3, 4 に示す。それぞれ、*C. tropicalis* 18 株での成績は AMPH に対して、FCM 法では 0.5~2 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、NCCLS 法は 0.5~2 $\mu\text{g/ml}$ にあり、分布域は同一であった。また、FLCZ (n=17) では、FCM 法では 0.125~64 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、NCCLS 法は 0.125~64 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。

これらの成績からは両法には極めてよい相関が認められた。

C. glabrata について

FCM 法と NCCLS 法での AMPH と FLCZ に対する感受性成績を表 5, 6 に示す。それぞれ、*C. glabrata* 27 株での成績は、AMPH に対しては、FCM 法は 0.5~4 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、NCCLS 法では 0.5~2 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。また、FLCZ (n=17) では、FCM 法は 0.125~64 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、NCCLS 法では 0.125~64 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。*C. glabrata* についても同様によい相関が見られた。

考 察

現在、酵母様真菌の薬剤感受性検査の国際的な標準法としては微量液体希釈法 NCCLS 法が検査室間や検査室内での再現性に優れているので推奨されている¹⁶。しかし、わが国ではこの標準法での検査法は全く普及しておらず、国際的には極めて立ち遅れた現状にある。

NCCLS の真菌薬剤感受性試験は再現性が優れた酵母菌の液体希釈薬剤感受性試験であり、半合成 RPMI 培地 (pH 7.0) を使用し、接種菌量、培養時間や最終判定点などを規定している¹⁷。

しかしながら本法では、培養を行い発育阻止の有無を判定しなければならず、培養時間には 48~72 時間を所用し、また、検査に際しては多くの作業時間を要する。

しかし、NCCLS による酵母様真菌の in vitro 薬剤感受性試験は、*Candida* species で主に実施されており、Anaissie ら¹⁸ の報告のように、ネズミを使った感染実験で、in vivo の成績と NCCLS 法での in vitro の成績に相関が認められている。そのため、本法の臨床面への応用は医真菌症の治療に大きく貢献しているのも事実である。

また、最近になって、E-test¹⁹、Bioscreen 微量希釈法や colourimetric method²⁰ などの測定法も開発されてきた。

さらに、近年では FCM 法による酵母様真菌の薬剤感受性測定が発表されるようになり、Maurice ら²¹は *Candida* species の AMPH 薬剤感受性測定を、ethidium bromide を使用し、8 時間での測定法を開発した。また Kirk ら²²は acridine orange や ethidium bromide を、Ramani ら²³は propidium iodide (membrane-impermeant DNA-intercalating dye) などの核酸を選択的に染色する蛍光色素による測定を行い、各測定条件を検討し、迅速感受性測定法として報告している。このように FCM 法では、多くの蛍光色素の特性が利用され、fluorescence probes の DNA や RNA 結合性、膜電位、膜透過性や選択的蛋白染色などを利用して²⁴⁻²⁶。

この研究で使用した蛍光色素 FUN-1 [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide] は酵母の増殖活性や代謝活性を明らかにし、従来の生菌と死菌とを識別するだけでなく、さらに感度が優れており、細胞の活性状態まで高感度に捉えることができる新しい種類の蛍光色素である。そして、この蛍光色素 FUN-1 は膜透過性核酸結合色素である。これまで、この FUN-1 色素を使った薬剤感受性試験は少ない。わずかに Wenisch らによる報告があるが、彼らの対象菌株 *C. albicans* 一菌種のみで、測定菌数も 6 株のみである。本研究では、対象菌数を増やし、*C. albicans* 以外で臨床検体からの分離頻度が高い *C. tropicalis*, *C. glabrata* を加えた。

代謝活性のある酵母細胞は、細胞内空胞に FUN-1 色素を取り込み、菌体内で FUN-1 代謝され、CIVS を形成するが、CIVS の形成には ATP が必要である²⁷。そして FUN-1 色素の核酸への結合から、より赤黄色にシフトした励起蛍光を発する。

また実験的研究により FUN-1 色素はチオール化合物と結合し、還元型グルタチオンと in vitro で反応し、610 nm で最大の励起蛍光を持つ、赤黄色の蛍光産物を生じることが明らかにされている²⁷。

FCM による薬剤感受性試験を実施するにあたり、上記した FUN-1 の酵母菌内での CIVS 形成を実証するため、蛍光顕微鏡下での CIVS 形成の有無を調べた。薬剤無添加のコントロールでは赤い蛍光 (585 nm) を発する CIVS が認められたが、70% エタノール添加の死菌には形成されなかった。

この結果、*Candida* の生菌は FUN-1 色素を取り込み CIVS を形成することが明らかになった。また、CIVS の形成は glutathione S-transferase の阻害剤により著しく低下するので FUN-1 は酵素を介してグルタチオンと結合すると考えられている²⁷。

AMPH を 3 時間被検菌に作用させた後、コント

ロール (抗菌剤無添加) と各種薬剤濃度別の検体での相対蛍光強度を測定したところ、濃度依存性に相対蛍光強度の低下が明らかであった。*Candida* species での感受性成績は *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata* のごとくなり、*C. tropicalis* に最も良い感受性を示した。これらの *Candida* 菌種の中には AMPH に対する耐性菌は認められなかった。3 時間と迅速に *Candida* の AMPH に対する薬剤感受性成績を得ることができるので、*Candida* 感染症に有用な薬剤感受性測定法である。

また、迅速な FCM 法として Ordonez ら²⁸は、蛍光色素 3,3'-dipentylloxycarbocyanine iodide (DiOC₂) を使用し、膜極性の変化をとらえる方法で 30 分 incubation 後で測定が可能であったとしている。同様に、Ordonez らの変法を行った Peyron ら²⁹は、DiOC₂ を使用し、RPMI を培地とした方法で、30 分の incubation で、NCCLS 法と同様の成績が得られたと述べている。さらに Gorman ら³⁰は ethidium bromide による AMPH の感受性試験で 8 時間の FCM 法を開発し、従来の希釈培養法よりも精度が優れているとしている。

FCM 法による MIC の設定は、NCCLS 標準法による MIC 値と対比させ、コントロール株 (100%) に比較して、薬剤添加検体の蛍光強度が 80% に減少した濃度とし、薬剤添加検体/コントロール×100 より相対蛍光強度をもとめ、それぞれの薬剤希釈系列について相対蛍光強度を測定したが、NCCLS 法と FCM 法には良い相関が見られた。

C. albicans の AMPH の MIC は 0.5~2 µg/ml と狭い範囲に 100% 収束し、NCCLS 法では 0.25~1 µg/ml となった¹⁶。両法には、1 管の差が得られたが、希釈法に基づく測定法では許容される誤差範囲である。この FCM 法による成績は諸氏ら^{18,23,31,32}の成績と一致する成績を得た。我々の成績では耐性株は見られなかったが、AMPH の治療による *Candida* 耐性株も報告されている³³⁻³⁸。

FLCZ では 0.125~64 µg/ml と AMPH に比較して低濃度から比較的高い濃度までの分布を示した。なお、NCCLS では *C. albicans* の FLCZ に対する break point は MIC < 8 µg/ml が感受性、MIC > 64 µg/ml を耐性としている。Pfaller ら³⁴は *Candida* species の FLCZ に対する MIC₉₀ は、*C. albicans* 1 µg/ml、*C. tropicalis* 1 µg/ml と *C. glabrata* 2 µg/ml としている。また、*C. tropicalis* や *C. glabrata* は FLCZ に対しては類似する MIC であった。しかし、*C. glabrata* は *C. albicans* よりも高い MIC であった。

FLCZ では、AMPH とは違って、耐性株が認めら

れるが、アゾールに対する薬剤耐性は、1. アゾール剤の標的酵素である14 α -ステロール脱メチル化酵素の過剰生産による薬剤作用の低下 2. 標的酵素の薬剤親和性の低下 3. 膜の変化による薬剤の透過性の低下 4. ポンプによる薬剤排出などが考えられている¹¹。

また、FLCZでは3時間の薬剤作用では蛍光強度による抗菌作用が明らかでなく、24時間の作用後で抗菌作用が認められ、AMPHと異なる成績が得られた。

この両薬剤での作用時間の差は、以下に示す薬剤の作用機序によるものと考えられる。ポルエン系抗生物質はマクロライド環を持ち、マクロライド環の疎水性領域は真菌細胞の細胞膜に含まれるエステル分子と特異的に結合し、ポルエン-エステル複合体を形成する。このエステルには細胞膜のリン脂質二重層の流動性を調節する機能がある。このためポルエン-エステル複合体の形成により、細胞膜の正常な機能が障害され、細胞の発育阻止や細胞死を起こすと言われている。

一方、トリアゾール系抗真菌剤は細胞膜チトクローム p-450 に作用して C-14 脱メチル化反応の段階に作用し、真菌のエルゴステロール合成を阻害する。これらの事実は Vanden ら³⁹の研究からも、アゾール系抗真菌剤によるエルゴステロール合成阻害が抗真菌作用に関連していることは十分に推測される⁴⁰。

しかし、ポルエン系抗生物質やイミダゾール剤と違い、細胞膜に対する直接的障害作用を示さないため、トリアゾール系薬剤の抗菌活性が比較的弱く、殺菌的効果が見られないのはそのためである。しかし、トリアゾール系化合物の親水基を持つ誘導体は、生体内での代謝を受けにくく、組織への移行が優れており、FLCZはフッ素を含むビストリアゾール誘導体であり、*in vitro* 抗菌試験では極めて弱い活性しか認められないにもかかわらず、マウスを用いた *C. albicans* の全身感染モデルによる動物実験ではケトコナゾールに優る効果を発揮すると言われている⁴⁰。

FLCZは生体内ではほとんど代謝されず、多くは血漿蛋白と結合せず、遊離型で存在し、血中半減期(約30時間)が極めて長いのが特徴である。このことから *in vitro* での抗菌活性は他の真菌剤に比べると弱い、血中半減期が長いので高い治療効果を発揮する。

真菌による日和見感染症は増加傾向にあるが、*Candida* 症の原因となる主たる菌種は、*C. albicans* (60~75%)、*C. tropicalis* (15~25%)と *C. glabrata*

(10~15%)である。今日、FLCZは深在性真菌感染症や食道カンジダ症などの治療に頻用されているが、耐性菌の存在も知られているので迅速な薬剤感受性試験を必要とする。

FUN-1を使用したFCM法による酵母様真菌の薬剤感受性試験は、従来法よりも検査時間が短く、迅速に薬剤感受性成績が得られるので、真菌症の治療に有用である。しかも標準法とされるNCCLS法ともよい相関が認められ、感度も優れ、再現性も良好であった。本法による薬剤感受性試験は真菌症の治療に大きな貢献をすることが期待できる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました恩師古田格教授に感謝いたします。また本研究に御協力いただきました臨床病理学教室ならびに中央臨床検査部細菌検査室の方々に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第45回日本臨床病理学会総会(平成10年11月、高知)において発表した。

文 献

1. Wingard JR (1995) Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 20: 115-125
2. Hazen KC (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8: 462-478
3. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP (1993) Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: Classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis* 17: S487-S491
4. NCCLS (1992) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed Standard. Document M27-P. NCCLS Vollanova Pa
5. NCCLS (1995) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative Standard. Document M27-T. NCCLS Wayne Pa
6. Banerjee SN, Emori TG, Culver DA, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edward JR, Tolson J, Henderson T, Maroane WJ (1991) Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States. *Am J Med* 91: 86-89
7. Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, Bennet JE, Feingold DS, Jorgenson J, Kobayashi GS, Shadomy S (1986) Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. *J Clin Microbiol* 23: 298-301
8. 山口英世 (1997) 抗真菌剤と薬剤感受性試験. *臨床病理特集* 105: 182-190
9. Pfaller MA, Buschelman B, Lancaster M, Espinal-Ingroff A, Rex JH, Rinaldi MG, Cooper CR, McGinnis MR (1995) Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B,

- fluconazole and flucytosine. *J Clin Microbiol* 33 : 1104-1107
10. Voss A, Pauw BE (1999) High-dose fluconazole therapy in patients with severe fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18 : 165-174
 11. 新見昌一, Cannon RD, 有沢幹雄 (1997) *Candida albicans* の薬剤耐性遺伝子. *Jpn J Med Mycol* 38 : 397-302
 12. White TC (1997) Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increased azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 41 : 1482-1487
 13. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39 : 2378-2386
 14. Fling ME, Koph J, Tamarkin A, Gorman JA, Smith HA, Koltin Y (1991) Analysis of *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and metotrexate. *Mol Gen Genet* 227 : 318-329
 15. 古田 格 (1993) フローサイトメトリーの臨床微生物学への応用. *Lab Clin Pract* 11 : 16-18
 16. Sanati H, Messer SA, Pfaller M (1996) Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* against fluconazole. *J Clin Microbiol* 34 : 1280-1282
 17. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC (1998) Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Mycol* 36 : 68-78
 18. Anaissie EA, Karyokakis NC, Hachem R, Dignani MC, Rex JH, Paetznick V (1994) Correlations between in vitro and in vivo activity of *Candida* species. *Antifung Agents J Infect Dis* 170 : 384-389
 19. Szekeley A, Johnson EM, Warnock DW (1999) Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J Clin Microbiol* 37 : 1480-1483
 20. Pfaller MA, Barry AL (1994) Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 32 : 506-509
 21. Maurice RG, Hopfer RL (1991) Amphotericin B susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *Cytometry* 12 : 743-747
 22. Kirk SM, Callister SM, Lim LC, Schell RF (1997) Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 35 : 358-363
 23. Ramani R, Ramani A, Wong SJ (1997) Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 35 : 2320-2324
 24. Wenisch (1995) Rapid susceptibility testing of flow cytometry using vital staining. *J Clin Microbiol* 35 : 5-10
 25. Hector RF, Braun PC, Hart JT, Kamarck ME (1990) The use of flow cytometry to monitor chitin synthesis in regenerating protoplasts of *Candida albicans*. *J Med Veter Mycol* 28 : 51-57
 26. Pore RS (1990) Antibiotic susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *Curr Microbiol* 20 : 323-328
 27. Millard PJ, Roth BL, Thi HT, Yue ST, Haugland RP (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Envir Microbiol* 63 : 2897-2905
 28. Ordonez JV, Natalie MW (1995) Amphotericin B susceptibility of *Candida* species assessed by rapid flow cytometric membrane potential assay. *Cytometry* 22 : 154-157
 29. Peyron F, Favel A, Guiraud-Dauriac H, Mzibri ME, Chastin C, Dumenil G, Regli P (1997) Evaluation of a flow cytofluorometric method for rapid determination of amphotericin B susceptibility of yeast isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 71 : 1537-1540
 30. O'Gorman MR (1991) Amphotericin B susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *Cytometry* 12 : 734-747
 31. Klepser ME (1997) Therapy of *Candida* infection: susceptibility testing, resistance and therapeutic options. *Ann Pharmacother* 32 : 1353-1361
 32. Yamazumi T (1998) Epidemiological and molecular biological studies of azole resistance in *Candida albicans*. *Acta Med Kinki Univ* 23 : 65-77
 33. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G (1988) Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am J Med* 84 : 826-832
 34. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG (1997) Antifungal susceptibility testing: Technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis* 24 : 776-784
 35. Merz WG, Sandfold GR (1979) Isolation and characterization of a polyene-resistant variation of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol* 9 : 677-680
 36. Merz WG (1984) *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol* 20 : 1194-1195
 37. Pappagianis D, Collins MS, Hector R, Remington J (1979) Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother* 16 : 123-126
 38. Wood RA, Bard M, Jackson IE, Drutz DJ (1974) Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J Infect Dis* 129 : 53-58
 39. Vanden BH (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol* 36 : 119-128
 40. 下岡新雄, 榎垣一憲, 関口金雄 (1989) トリアゾール系抗真菌剤 Fluconazole の体内動態. *化学療法の領域* 5 : 75-81